

左歸飲과 右歸飲에 의한 活性 酸素類의 消去 作用과 抗酸化 酵素系의 活性 增加 效果에 對한 研究

鄭 智 天

ABSTRACT

Increased antioxidant enzyme activities and scavenging effect of oxygen free radicals by Jwagyuyueum and Woogyuyueum

Ji-Cheon Jeong

Dept. of Internal Medicine

College of Oriental Medicine, Dongguk University

This study was undertaken to examine the effect of Jwagyuyueum and Woogyuyueum, being known to reinforce *Kidney-yin and yang*, on the activities of endogenous antioxidant enzymes and the production of oxygen free radicals in the liver and kidney tissues. Alterations in enzyme activities were observed after *in vivo* treatment in rats. Jwagyuyueum and Woogyuyueum caused a significant increase in the activities of superoxide dismutase(SOD) and catalase.

Jwagyuyeuem significantly increased the activity of glutathione peroxidase in both liver and kidney, but the enzyme activity was not significantly altered by Woogyuyeuem. Treatment *in vitro* of Jwagyuyeuem and Woogyuyeuem decreased the production of oxygen free radicals in a dose-dependent fashion.

These results suggest that Jwagyuyeuem and Woogyuyeuem stimulate the activities of antioxidant enzymes and inhibit directly the production of oxygen free radicals. These effects of both herbs may contribute to prevent the oxygen free radical-induced impairment of cell function.

Key Word : Jwagyuyeuem, Woogyuyeuem, oxygen free radical, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase.

I . 緒 論

活性酸素類들(oxygen free radicals)은 分子狀態의 酸素가 生體內 酸化還元 反應의 전자수용체로 利用되므로서 持續적으로 還元되어 가는 中에 生成되는 不完全한 酸素의 還元 形態로 superoxide anion($\cdot O_2$) 및 hydroxyl radical($\cdot OH$), hydrogen peroxide(H_2O_2)¹⁾ 등이 있다.

이러한 活性酸素類들은 여러 組織에서 甚한 毒性을 나타내어 痴呆, 心筋梗塞, 腎不全, 癌 等 많은 疾病을 일으키는 病因일 뿐만 아니라 老化에도 關係가 있는데,²⁻⁵⁾ xanthine oxidase⁶⁾와 aldehyde oxidase⁷⁾ 等の 酵素들이 生成에 關與하며, superoxide dismutase(SOD),⁸⁾ catalase⁹⁾ 및 glutathione peroxidase¹⁰⁾ 等の 酵素에 依하여 分解되어진다.

또한 活性酸素에 依한 過酸化脂質의 生成도 成人病의 發病過程과 疾病의 進行 및 老化現象과 密接한 關係가 있다고 알려져 있다.¹¹⁻¹³⁾ Yagi 等^{14,15)}은 年齡이 增加함에 따라 過酸化脂質의 含量이 比例的으로 增加한다고 하였고, 王¹⁶⁾에 依하면 老年群의 境遇 青年群에 比하여 約 1.5倍 程度의 含量 增加 現象이 觀察된다고 하였다.

東醫學에서 活性酸素와 關聯된 研究는 老化의 重要 原因인 腎虛에 對하여 主로 이루어졌는데^{17,18)} 腎虛群에서 過酸化脂質 含量이 上昇하고¹⁹⁾ SOD 活性이 低下되어 있으며²⁰⁾, 補腎 效能을 가진 五子衍宗液¹⁶⁾, 還少丹²¹⁾, 清宮長春丹²²⁾ 等の 處方들이 過酸化脂質의 含量을 低下시키고 SOD 活性을 上昇시켜 老化를 抑制한다고 報告되고 있다.

著者는 以前 研究에서 主로 抗老化 作用을 가

진 藥物들로 構成되어²³⁾ 腎陰과 腎陽을 補하는 左歸飲과 右歸飲²⁴⁾이 흰쥐의 肝과 腦에서 活性 酸素 生成系 酵素인 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase 活性을 有意性 있게 抑制시키며, 또한 活性 酸素에 依해 誘導되는 脂質의 過酸化反應을 抑制시키는 效能이 있음을 報告^{25,26)} 하였다. 그러나 活性 酸素 分解系 酵素에 關係서는 右歸飲이 흰쥐의 血清中 SOD 活性을 增加시켰다는 申²⁷⁾의 報告가 있을 뿐이다.

따라서 本 研究에서는 左歸飲과 右歸飲이 活性 酸素 分解系 酵素 活性에 미치는 影響을 檢討하고 試驗管內에서 活性 酸素類의 直接的인 除去 效果를 觀察하였던 바 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗 材料 및 方法

1. 材料

(1) 藥材

이 實驗에 使用한 藥材는 東國大學校 附屬 韓方病院에서 購入한 後 精選하여 使用하였으며, 1貼의 內容과 分量은 다음과 같다.

1) 左歸飲

熟地黃	Rehmanniae Radix	12 g
山藥	Dioscoreae Rhizoma	8 g

枸杞子	Lycii Fructus	8 g
山茱萸	Corni Fructus	8 g
白茯苓	Hoelen Alba	4 g
炙甘草	Glycyrrhizae Radix	4 g

Total amount		44 g
--------------	--	------

2) 右歸飲

熟地黃	Rehmanniae Radix	12 g
山藥炒	Dioscoreae Rhizoma	8 g
枸杞子	Lycii Fructus	8 g
杜冲鹽製	Eucommiae Cortex	8 g
山茱萸	Corni Fructus	4 g
肉桂	Cinnamomi loueirii	4 g
附子炮	Aconiti Tuber	4 g
炙甘草	Glycyrrhizae Radix	4 g

Total amount		52 g
--------------	--	------

(2) 實驗 動物

外觀上 健康한 280-350g의 雄性 Sprague-Dawley 系 rat을 實驗前 16時間 동안 물만 주고 絶食시켜 使用하였다.

(3) 試藥 및 機器

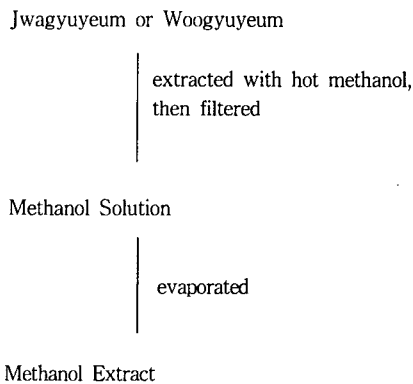
實驗에 使用한 機器는 refrigerated centrifuge(Hanil supra 22K), ultracentrifuge (Dupont Sorval OTD 65B), spectrophotometer(Shimadzu 2021) 등이었다.

2. 實驗 方法

(1) 左歸飲 및 右歸飲의 抽出物 製造

左歸飲 및 右歸飲 3貼 分量에 各各 500ml의 methanol을 加한 다음 60°C에서 24時間 間隔으로 3回 反復 抽出하여 濾過한 後, 濾液을 減壓 濃縮器로 濃縮하여 methanol extract 左歸飲 26g 및 右歸飲 28.6g을 얻었다. (Scheme 1.)

試料는 1% CMC(carboxymethyl cellulose) 溶液에 懸濁시킨 左歸飲 및 右歸飲 抽出物을 實驗 動物의 體重 kg當 200mg의 用量으로 1日 1回 15日間 esophagus needle을 使用해 經口投與하였으며, 對照群은 같은 方法으로 1% CMC 溶液만 經口投與하였다.

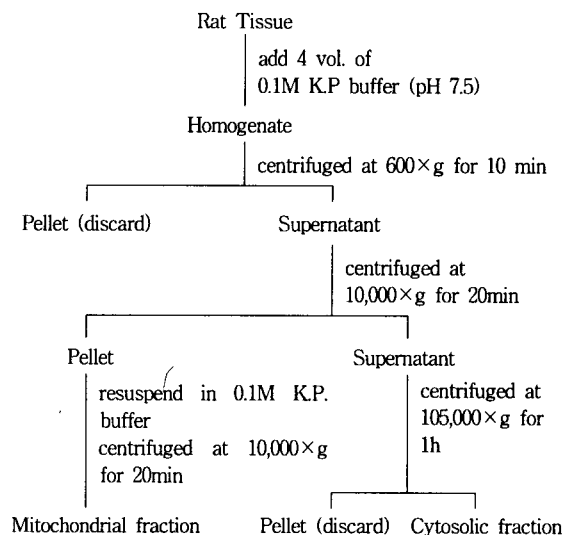


Scheme 1. Extraction of Jwagyuyeuem or Woogyuyeuem with Methanol

(2) 酵素源의 製造

動物은 ether로 痲醉시킨 다음 腹部 正中線을 따라 開腹하여 下大動脈으로 부터 採血한 後 生理食鹽水로 貫流시킨 肝臟과 腎臟을 摘出하여 食鹽食鹽水로 깨끗이 씻고 濾紙로 壓迫하여 남아 있는 血液 및 生理食鹽水를 除去한 後 組織 1g當

4倍量의 0.1M potassium phosphata buffer (pH 7.5, 以下 K.P buffer로 略함)를 加하여 氷冷下에서 glass teflon homogenizer로 磨碎하여 均質液을 만들었다. 이 磨碎均質液을 600×g에서 10分間 遠心分離하여 核 및 未磨碎部分을 除去한 上澄液을 얻고 이것을 다시 10,000×g에서 20分間 遠心分離하여 mitochondrial fraction을 얻었다. 한편, mitochondrial fraction을 除去시킨 上澄液을 105,000×g에서 1時間 동안 超遠心分離하여 cytosol fraction을 分離하였다. Cytosol fraction은 aldehyde oxidase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase 및 xanthine oxidase 活性 測定 酵素源으로 使用하였으며 mitochondrial fraction은 0.1 M K.P buffer에 懸濁시킨 다음 再遠心分離하였다. 이때 얻은 沈澱物을 一定量의 0.1 M K.P buffer에 再懸濁시켜 freezing & thawing한 다음 catalase 活性 酵素源으로 使用하였다. 以上の 모든 操作은 0-4°C에서 行하였다. (Scheme 2.)



Scheme II. Preparation of mitochondrial and cytosolic fraction

(3) 酵素 活性의 測定

1) Superoxide dismutase 活性 測定

Superoxide dismutase 活性 測定은 Martin等²⁸⁾의 方法에 準해 實施하였다. 酵素源 製造 方法에 따라 分離된 cytosolic fraction에 EtOH : CHCl₃ (5:3) 混液 0.4倍量을 加하여 잘 混合한 다음 10,000×g에서 20分間 遠心分離 하였다. 反應液은 50 mM K.P. buffer (pH 7.5, EDTA 0.1 mM 含有) 一定量에 5 mM hematoxylin 酵素液의 用量을 달리 하여 添加하고 最終 反應液이 3.0ml가 되게 하였다. 이 反應液을 25℃에서 5分間 反應시킨 다음 560nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 酵素 活性을 算定하였다. 酵素 活性의 unit는 酵素를 넣지 않고 反應시킨 5 mM hematoxylin液의 吸光度 增加를 50% 抑制하는 蛋白質의 量으로 算定하였다.

2) Catalase 活性 測定

Catalase 活性 測定은 Aebi⁹⁾의 方法에 準해 50 mM K.P. buffer (pH 6.8)에 기질인 H₂O₂ 10.5 mM 및 酵素液을 添加하여 最終 反應液이 3.0ml가 되게 하였다. 이 反應液을 25℃에서 30秒間 反應시키면서 240nm에서 H₂O₂의 分解 程度를 測定하여 分子 吸光計數(E₂₄₀=0.041 mM⁻¹ cm⁻¹)를 利用하여 酵素의 活性度를 算定하였다. 酵素의 活性度는 1分當 1mg의 蛋白質이 分解시킨 H₂O₂의 量을 μmole로 나타내었다.

3) Glutathione peroxidase 活性 測定

Glutathione peroxidase 活性 測定은 Paglia等²⁹⁾의 方法에 準해 一定量의 0.1 M Tris·HCl buffer(pH 7.2) 溶液에 基質인 H₂O₂, 1 mM GSH, GR(2 I.U.), 0.2 mM NADPH 및 酵素源을 添加하여 25℃에서 5分間 反應시키는 동안에 生成되는 GSSG를 還元시키는데 消費된 NADPH의 含量을 340nm에서 測定하여 그 活性을 算定하였다. 酵素의 活性은 1分當 1mg의 蛋白質이 酸化시킨 NADPH의 量을 nmole로 나타내었다.

4) Hydroxyl radical 含量 測定

Hydroxyl radical 含量 測定은 Richmond 等³⁰⁾의 方法에 따라 0.1 M KH₂PO₄·KOH buffer (pH 7.4)에 2.5 mM sodium salicylate, 0.3 mM EDTA, 0.1 mM FeSO₄, 1 mM H₂O₂, 0.2 mM hypoxanthine 및 xanthine oxidase를 添加시켜 25℃에서 90分間 反應시킨 다음 11.65 N HCl로 反應을 終了시키고 反應 產物을 ether로 이행, 抽出, 乾燥시킨 후 蒸溜水 1ml에 녹여 10% TCA, 10% sodium tungstate, 0.5% sodium nitrite 및 0.5 M KOH 溶液을 加해 發色시킨 後 波長 510nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 hydroxyl radical의 含量을 算定하였다.

Hydroxyl radical의 含量은 上記 反應에서 salicylic acid로부터 hydroxyl radical에 의해 生成된 2,3-dihydroxy benzoic acid 量을 nmoles로 나타내었다.

5) Superoxide radical 含量 測定

Superoxide radical 含量 測定은 Azzi 等³¹⁾의 方法에 準해 50 mM K.P. buffer(pH 7.5) 一定 量에 基質인 90 mM succinate, 150 mM KCl, 30 mM KCN, 0.3 mM cytochrome c 및 mitochondria 酵素源을 添加하여 最終 反應液이 3.0ml가 되게 하였다. 이 反應液을 37°C에서 2分 間 反應시키면서 550nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 superoxide radical의 含量을 算定하였다. Superoxide radical 含量은 1mg의 蛋白質이 1分 間 生成시킨 reduced cytochrome C의 量을 nmoles로 나타내었다.

(4) 蛋白質의 定量

蛋白質의 定量은 Lowry 等⁵⁹⁾의 方法에 準해 bovine serum albumin을 標準品으로 하여 定量하였다. 한편, 實驗 結果의 有意性 檢定은 Student's *t*-test를 利用하여 相互比較하여 觀察하였다.

III. 實驗 成績

1. Rat에서 肝 Superoxide Dismutase 活性度の 變化

흰쥐에 左歸飲과 右歸飲 抽出物을 15日間 經口投與한 후 肝에서의 superoxide dismutase 活性의 變化를 관찰하였다. 對照群이 5.28 ± 0.55 units/mg protein인 반면, 左歸飲 投與群은 9.00

± 0.58 units/mg protein으로 約 70%의 有意性 있는 增加를, 右歸飲 投與群은 7.91 ± 0.41 units/mg protein로 約 50%의 有意性 있는 增加를 보였다. (Fig. 1)

2. Rat에서 腎 Superoxide Dismutase 活性度の 變化

腎에서의 SOD의 活性은 對照群이 3.77 ± 0.31 units/mg protein인 반면, 左歸飲 投與群은 6.18 ± 0.48 units/mg protein으로 約 64% 增加되었으며, 右歸飲 投與群은 5.74 ± 0.44 units/mg protein으로 나타나 對照群에 比하여 約 52%의 有意性 있는 增加를 보였다. (Fig. 2)

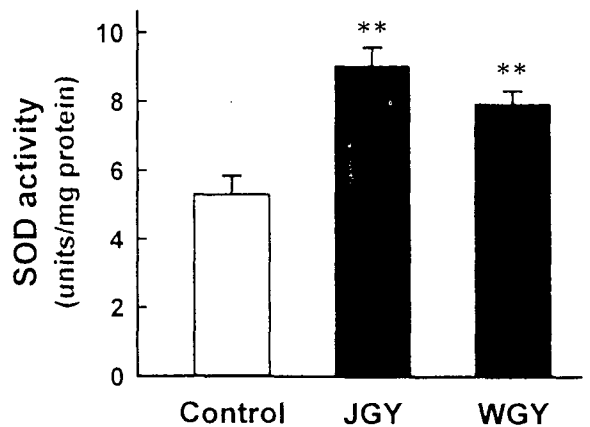


Fig. 1. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyueum (JGY) or Woogyuyueum (WGY) on Hepatic Cytosolic Superoxide Dismutase Activity in Rat.

Rats were received the MeOH extracts of JGY or WGY (200mg/kg, p.o.) for 15 days. Values are mean \pm S.E. for 5 animals. Significantly different from control. (** : $p < 0.01$)

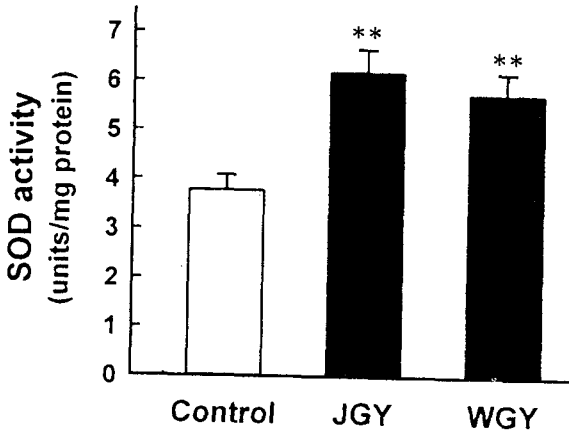


Fig. 2. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeuem (JGY) and Woogyuyeuem (WGY) on the Renal Cytosolic Superoxide Dismutase Activity in Rat.

Rats were received the MeOH extracts of JGY or WGY(200mg/kg, p.o.) for 15 days.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 5 animals.

Significantly different from control.

(**: $p < 0.01$)

3. Rat에서 肝 Catalase 活性度の 變化

肝에서의 Catalase 活性은 對照群이 $2.04 \pm 0.14 \mu\text{ moles/mg protein/min}$ 인 반면, 左歸飲 投與群은 $2.76 \pm 0.12 \mu\text{ moles/mg protein/min}$, 右歸飲 投與群은 $2.59 \pm 0.10 \mu\text{ moles/mg protein/min}$ 로 나타나 對照群에 比하여 各各 約 35%, 27%의 有意性있는 增加를 나타내었다. (Fig. 3.)

4. Rat에서 腎 Catalase 活性度の 變化

腎에서의 Catalase 活性은 左歸飲 投與群이 $2.33 \pm 0.17 \mu\text{ moles/mg protein/min}$ 로 나타나 對照群의 $1.52 \pm 0.13 \mu\text{ moles/mg protein/min}$ 에 比하여 約 53% 增加되었으며, 右歸飲 投與群은 $2.21 \pm 0.18 \mu\text{ moles/mg protein/min}$ 로 나타나 約 45% 增加되어 各各 $p < 0.01$, $p < 0.05$ 의 有意性 있는 增加를 나타내었다. (Fig. 4.)

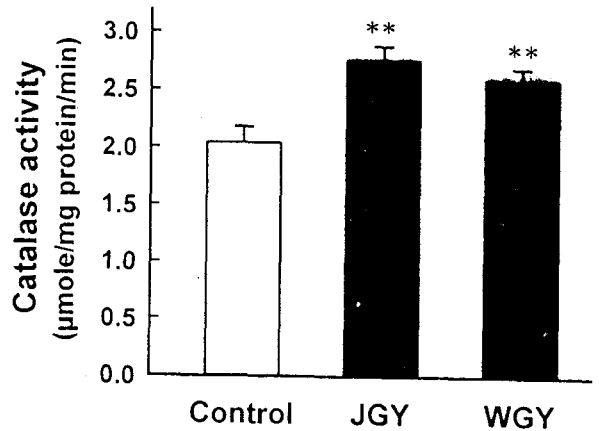


Fig. 3. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeuem (JGY) or Woogyuyeuem (WGY) on Hepatic Mitochondrial catalase Activity in Rat.

Rats were administered the MeOH extracts of JGY or WGY (200mg/kg, p.o.) for 15 days.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 5 animals.

Significantly different from control.

(** : $p < 0.01$)

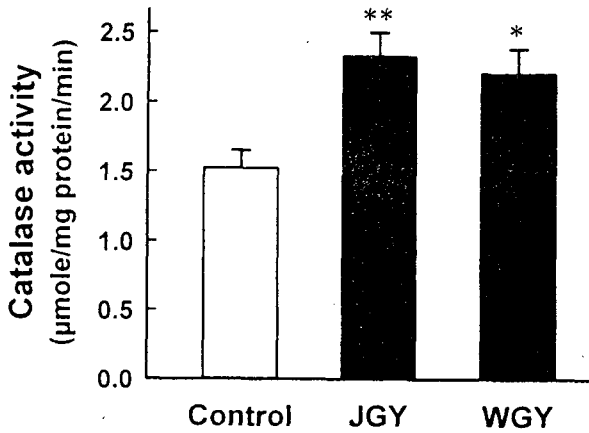


Fig. 4. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeuum (JGY) or Woogyuyeuum (WGY) on the Renal Mitochondrial catalase Activity in Rat.

Rats were received the MeOH extracts of JGY or WGY(200mg/kg, p.o.) for 15 days.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean \pm S.E. for 5 animals.

Significantly different from control.

(*:p<0.05, **:p<0.01)

5. Rat에서 肝 Glutathione Peroxidase 活性度の 變化

活性 酸素의 毒性을 抑制하기 爲한 生體內에 서의 또 다른 防禦 酵素中의 하나인 glutathione peroxidase의 活性에 미치는 左歸飲과 右歸飲의 影響을 觀察하였다. 肝에서의 glutathione peroxidase 活性은 對照群이 246.5 ± 20.7 nmoles/mg protein/min인 반면, 左歸飲 投與群은 333.2 ± 27.3 nmoles/mg protein/min로 나타나 約 35%의 有意性 있는 增加를 보였으며 右歸飲 投與群은 317.3 ± 29.5 nmoles/mg protein/min로 增加하였으나 有意性은 認定되지 않았다. (Fig. 5.)

6. Rat에서 腎 Glutathione Peroxidase 活性度の 變化

腎에서의 glutathione peroxidase 活性은 對照群이 184.3 ± 16.4 nmoles/mg protein/min인 반면, 左歸飲 投與群은 261.7 ± 23.6 nmoles/mg protein/min로 나타나 約 42%의 有意性 있는 增加를 보였으며 右歸飲 投與群은 220.6 ± 19.1 nmoles/mg protein/min로 增加하였으나 有意性은 認定되지 않았다. (Fig. 6)

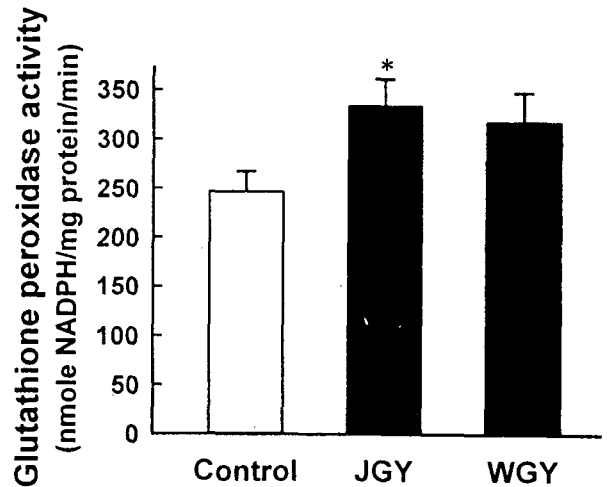


Fig. 5. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeuum (JGY) or Woogyuyeuum (WGY) on Hepatic Cytosolic Glutathione Peroxidase Activity in Rat.

Rats were administered the MeOH extracts of JGY or WGY (200mg/kg, p.o.) for 15 days.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean \pm S.E. for 5 animals.

Significantly different from control.

(* : p<0.05)

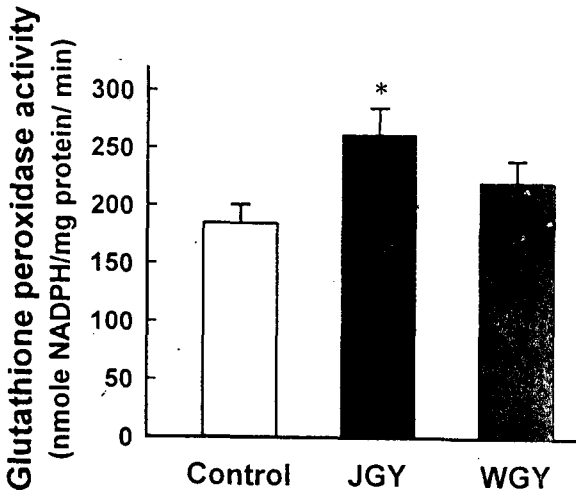


Fig. 6. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeuem (JGY) or Woogyuyeuem (WGY) on the Renal Cytosolic Glutathione Peroxidase Activity in Rat.

Rats were received the MeOH extracts of JGY or WGY(200mg/kg, p.o.) for 15 days.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean \pm S.E. for 5 animals.

Significantly different from control.

(* : $p < 0.05$)

7. 試驗管内에서 Superoxide radical의 生成에 미치는 影響

試驗管内에서 一時的으로 superoxide radical의 含量을 增加시키는 條件에서 左歸飲과 右歸飲의 影響을 살펴 보기 爲하여 左歸飲과 右歸飲의 抽出物 添加量을 漸次的으로 增加시키면서 superoxide radical의 生成을 觀察하였다. 左歸飲과 右歸飲 抽出物을 1×10^{-3} g/ml까지 變化시켜 觀察한 結果, 濃度 依存的으로 superoxide radical의 生成이 減少되어 첨가 濃도가 1mg/ml 일때 左歸飲 投與群은 7.04 ± 0.64 nmoles/mg protein/hr로, 右歸飲 投與群은 7.98 ± 0.76

nmoles/mg protein/hr로 나타나 對照群에 比하여 各各 約 49%, 42%로 superoxide radical의 生成을 有意性 있게 억제시켰다. (Fig. 7.)

8. 試驗管内에서 Hydroxyl radical 生成에 미치는 영향

同一한 方法으로 試驗管内에서 左歸飲과 右歸飲의 濃度를 漸次的으로 增加시키면서 hydroxyl radical의 生成을 觀察한 結果, 添加量이 增加함에 따라 hydroxyl radical의 生成이 減少하였다. 添加 濃도가 1mg/ml 일때 左歸飲 投與群은 15.84 ± 1.49 nmoles/mg protein/hr로, 右歸飲 投與群은 19.04 ± 1.86 nmoles/mg protein/hr으로 나타나 對照群에 比하여 各各 約 58%, 49%로 顯著하게 抑制되었다. (Fig. 8.)

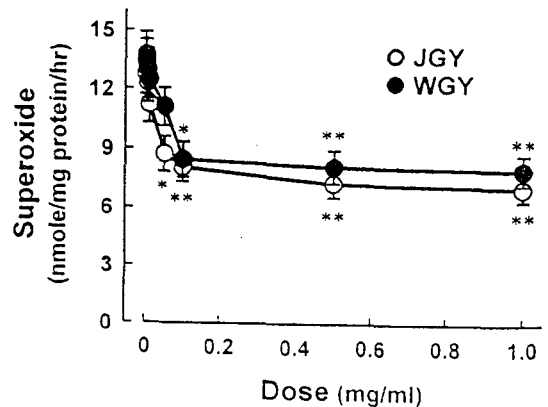


Fig. 7. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeuem (JGY) or Woogyuyeuem (WGY) on the level of Superoxide anion radical in vitro.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean \pm S.E. for 3 separate experiments.

Significantly different from control.

(*:p<0.05,**:p<0.01)

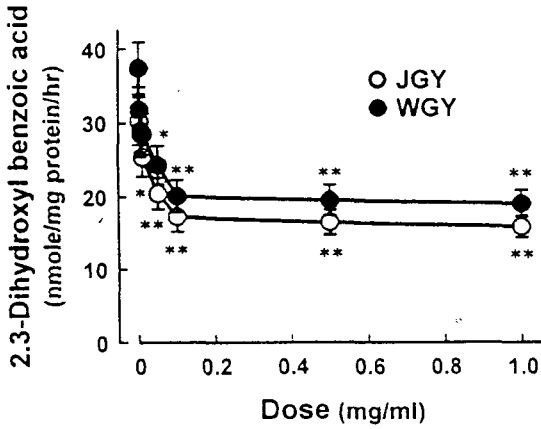


Fig. 8. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeuem (JGY) or Woogyuyeuem (WGY) on the level of Hydroxyl radical *in vitro*.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean \pm S.E. for 3 separate experiments.

Significantly different from control.

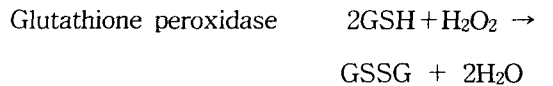
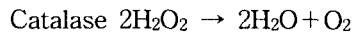
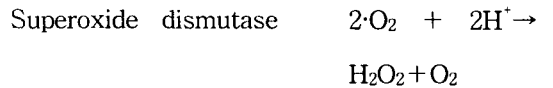
(*:p<0.05,**:p<0.01)

IV. 考 察

生體가 外部로부터 放射線 또는 紫外線을 받거나 重金屬 및 有機溶劑의 吸入, 抗生劑 등 合成藥品의 濫用, 過度한 肉體的, 精神的 스트레스 등을 받게 되면 體內에서 生化學的 酸化 反應이 促進되고 이와 竝行하여 free radical의 生成이 增加하게 되는데 이러한 free radical類에 依하여 細胞나 組織이 損傷을 받게 되거나 過酸化脂質의 生成이 誘導되기 때문에 老化가 促進된다고 한다.¹²⁾

過酸化脂質 生成의 原因이 되는 活性 酸素類들은 superoxide anion radical($\cdot O_2$), hydrogen peroxide(H_2O_2) 및 hydroxyl radical($\cdot OH$) 등¹⁾이 있으며, 이들 中 hydroxyl radical이 가장 強力한 活性을 지니는 것으로 알려져 있다.³³⁻³⁵⁾ 生體內에서 活性 酸素는 xanthine oxidase, aldehyde oxidase³⁶⁾ 및 microsomal mixed function oxidase,^{37,38)} catecholamines, hemoprotein³⁹⁾ 등의 自動 酸化에 依해서도 生成되며 또한, 活性 酸素의 分解系 酵素인 superoxide dismutase(SOD),⁸⁾ catalase⁹⁾ 및 glutathione peroxidase¹⁰⁾ 등에 依해서 分解된다.

SOD는 superoxide radical($\cdot O_2$)을 hydrogen peroxide(H_2O_2)와 酸素(O_2)로 轉換시키고, catalase는 hydrogen peroxide를 再次 물(H_2O)로 還元시키며, glutathione peroxidase 또한 hydrogen peroxide를 물(H_2O)로 還元시키는 反應을 促進하여 superoxide radical로부터 細胞를 保護하는데 重要な 役割을 擔當하고 있다.⁴⁰⁾



(GSH : 환원형 glutathione,

GSSG : 산화형 glutathione)

이러한 活性 酸素를 除去하는 抗酸化劑에 關한

東醫學에서의 研究는 主로 腎虛에 對하여 이루어지고 있다. 腎의 作用은 腎陰과 腎陽의 兩方面으로 概括되는데 腎陰은 一身의 陰液의 根本으로서 濡潤, 滋養作用을 하며, 腎陽은 人體 陽氣의 根本이자 先天의 眞火로서 溫煦, 氣化作用을 하여 腎陰과 더불어 發育과 生殖을 促進한다.^{41,42)} 그러므로 內經·素問⁴³⁾에 ‘天壽過度 氣脈常通 而腎氣有餘也’, 虞⁴⁴⁾가 ‘腎元盛則壽延 腎元衰則壽夭’라고 하여 長壽하는 것이 腎氣의 盛衰與否에 依하여 決定된다고 하였으며, 腎氣虛衰가 老化의 重要 原因이라고 하였다.²³⁾

左歸飲은 張²⁴⁾이 六味地黃湯에서 涼性의 牧丹皮와 泄腎經之火하는 澤瀉를 去하고 滋補肝腎하는 枸杞子와 益氣健脾하는 炙甘草를 加하여 補而不瀉하고 補益腎陰의 效能을 增強시킨 純補壯水之劑로 腎陰虛가 比較的 重한 경우에 使用된다.^{45,46)} 右歸飲은 張²⁴⁾이 八味地黃湯에서 清熱의 牧丹皮, 澤瀉, 茯苓을 去하고 補腎益精의 枸杞子, 杜冲을 加하고 再次 補中益氣의 炙甘草를 加하여 補而不瀉하고 溫補腎陽의 效能을 增強시킨 益火之原의 方劑로서 腎陽虛가 比較的 重한 경우에 使用된다.^{45,46)}

構成 藥物에 對한 實驗 研究에 依하면 熟地黃, 山茱萸, 枸杞子, 杜冲, 肉桂 等の 藥物이 過酸化脂質의 生成을 抑制시키고,⁴⁷⁻⁵¹⁾ 枸杞子, 山藥, 熟地黃 等の 藥物은 SOD의 活性을 增加시켰으며,^{49,50,52)} 枸杞子, 杜冲, 肉桂 等은 實驗動物의 壽命을 延長시키는 效果가 있음이 밝혀졌다.^{53,54)}

本 實驗에서는 左歸飲과 右歸飲 抽出物을 원주에 15일간 經口投與한 후 肝臟과 腎臟 組織에서 活性酸素 分解系 酵素 活性에 對한 影響을 觀察하고 試驗管內에서 活性酸素類의 直接的인 除去 效果를 檢討하였다.

毒性이 強한 superoxide anion을 보다 毒性이 弱한 hydrogen peroxide로 轉換시키는 酵素인 SOD의 活性 變化를 살펴보면, 左歸飲과 右歸飲 投與群 모두 實驗動物의 肝臟과 腎臟에서 SOD의 活性을 有意性 있게 增加시켰으며 左歸飲 投與群에서 그 增加 程度가 더욱 強하였다. 이와 같은 結果는 實驗動物의 肝臟 SOD 活性이 增加할수록 壽命이 延長된다는 報告⁵⁵⁾와 關聯시켜 볼 때 左歸飲과 右歸飲은 老化를 抑制시키는 效果가 있을 것으로 여겨진다.

Catalase는 free radical에 依한 細胞 毒性時 初期에 反應하는 重要한 抗酸化 酵素⁵⁶⁾로 hydrogen peroxide를 分解함으로써 hydrogen peroxide 增加에 따른 組織 損傷을 防止하는 效果가 있으며⁵⁷⁾, 여러 臟器에서 多樣하게 存在하지만 腎臟과 肝臟에서 活性도가 特히 높다.⁵⁸⁾ SOD에 依한 superoxide anion의 分解産物인 hydrogen peroxide를 除去하는 catalase 活性 變化를 살펴보면, 左歸飲과 右歸飲 投與群 모두 實驗動物의 肝臟과 腎臟에서 catalase의 活性이 有意性 있게 增加되었으며 左歸飲 投與群에서 그 增加 程度가 더욱 強하였다.

Glutathione peroxidase는 glutathione을 媒介로 하여 hydrogen peroxide를 還元시킬 뿐만 아

나라 lipid peroxide를 lipid alcohol로還元시켜無毒化시키는酵素이다. Glutathione peroxidase의活性變化를 살펴보면 左歸飲 投與群은 肝臟과 腎臟에서 對照群에 比하여 各各 約 35%, 42%의 有意性 있는 增加를 보였으며 右歸飲 投與群은 肝臟과 腎臟에서 對照群에 比해 모두 增加하였으나 有意성은 認定되지 않았다.

本 實驗에서 左歸飲과 右歸飲이 모두 活性酸素類를 分解시키는 SOD, catalase 및 glutathione peroxidase의 活性를 增加시켰는데 이러한 增加 現狀이 어떤 機轉으로 나타났는지에 對해서는 알 수가 없다. 그러나 이들 藥物들이 어떤 機轉으로 酵素의 活性를 增加시켰던지 間に 이러한 效果는 活性酸素類에 依해 誘發될 수 있는 여러가지 病的 狀態를 豫防할 수 있는 可能性을 提示하고 있다.

試驗管內에서 左歸飲과 右歸飲의 superoxide radical에 對한 直接的인 消去 效果를 檢討하였을 때 左歸飲과 右歸飲의 添加 濃도에 依存的으로 superoxide radical의 含量이 減少하였다. 또한, 活性 酸素中 가장 強力한 活性를 지니고 있는 hydroxyl radical에 對한 左歸飲과 右歸飲의 作用을 살펴 본 결과 濃度 依存的으로 hydroxyl radical의 生成을 有意性 있게 減少시키는 것을 나타냈다.

以上の 結果를 綜合하여 보면, 左歸飲과 右歸飲은 oxygen free radical의 分解系 酵素인 SOD, catalase 및 glutathione peroxidase의 活性를 增加시키며 또한 活性酸素類인 superoxide

radical과 hydroxyl radical을 직접 消去시키는 作用을 가지는 것으로 여겨진다.

그리고, 左歸飲과 右歸飲이 活性酸素 生成系 酵素인 xanthine oxidase와 aldehyde oxidase의 活性和 過酸化脂質 生成을 直接 抑制한다는 報告(83,84)와 關聯시켜 볼 때, 이들 藥物들이 活性酸素類의 生成을 抑制할 뿐만 아니라 生成된 活性 酸素類를 消去하는 作用도 가지고 있어 이러한 作用을 통해 老化를 防止하는 效果를 나타낼 可能性을 強力히 示唆하고 있다.

V. 結 論

左歸飲과 右歸飲이 老化와 關聯된 活性 酸素類의 分解에 미치는 影響을 알아보기 爲하여 흰쥐에 抽出物을 經口投與한 後 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathione peroxidase 活性的 變化와 試驗管內에서 superoxide radical, hydroxyl radical 消去 效果를 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 肝에서 SOD 活性 變化는 對照群에 比하여 左歸飲 投與群은 約 70%, 右歸飲 投與群은 約 50%의 有意性 있는 增加를 보였다. 腎에서 SOD 活性는 對照群에 比하여 左歸飲 投與群은 約 64%, 右歸飲 投與群은 約 52% 增加되었다.

2. 肝에서 catalase 活性은 對照群에 比하여 左歸飲 投與群은 約 35%, 右歸飲 投與群은 約 27%의 有意性 있는 增加를 보였다. 腎에서는 對照群에 比하여 左歸飲과 右歸飲 投與群이 各各 約 53%와 45% 增加되었다.

3. 左歸飲을 投與한 흰쥐에서 glutathione peroxidase 活性은 肝에서 約 35%, 腎에서 約 42% 增加를 보였으나, 右歸飲은 兩 組織에서 酵素 活性을 增加시키는 樣相을 보였으나 統計的인 有意性은 認定되지 않았다.

4. 試驗管內에서 左歸飲과 右歸飲은 藥物의 濃度에 比例하여 superoxide radical과 hydroxyl radical의 生成을 減少시켰다.

以上の 結果로 보아 흰쥐의 肝과 腎臟 組織에서 左歸飲과 右歸飲은 oxygen free radical 分解系 酵素인 SOD, catalase 및 glutathione peroxidase의 活性을 增加시킴과 同時에 superoxide radical과 hydroxyl radical을 直接 消去시키는 作用을 통해 老化를 防止하는데 도움을 줄 것으로 思料된다.

参 考 文 獻

1. Batteli, N. G., Lorenzoni, E. and Stirpe, F. : Milk xanthine oxidase type D (dehydrogenase) and type O(oxidase) :

Purification and interconversion and some properties. *Biochem.J.*, 131:191-198, 1973.

2. Floyd R.A. : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.*, 4:2587-2597, 1990.

3. Jaeschke H. : Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 209:104-111, 1995.

4. Reiter RJ : Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.*, 9:526-533, 1995.

5. Walker PD and Shah SV : Evidence of the role of hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest*, 81:334-341, 1988.

6. Fridovich, I. and McCord, J. M. : Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J.Biol.Chem.*, 244:6049-6055, 1969.

7. Bell, R. R., Blanchard, C. A. and Haskell, B. E. : Metabolism of vitamin B₆ in the I-strain mouse. *Arch.Biochem.Biophys.*, 147 : 602, 1971.

8. McCord, J. M. : Free radical and inflammation : Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, 185:529-531, 1974.

9. Aebi, H. : La Catalase erythrocytaire, in : Exposes Annuels de Biochimie Medicale, 29 ieme serie, Masson & Cie(eds), Paris,

- pp.139-164, 1969.
10. Little, C. and O'Brien, P. J. : An intracellular GSH-peroxidase with lipid peroxide substrate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 31:145-150, 1968.
 11. 최진호 : 노화의 메카니즘과 연구방향, *생화학뉴스*, 한국생화학회, 5(3):39-53, 1985.
 12. Harman, D : Free radical theory of aging ; Role of free radicals in the organization and evolution of life, aging and disease processes. *Free Radicals, Aging and Degenerative Disease* (ed. Johnson, J.E. et al.), Alan R.Liss, Inc., New York, pp.3-49, 1986.
 13. Milan L., Jozef R., Vilian K., Peter P. and Ladislav V.: Free Radicals in Chemistry and Biology, CRC Press, pp.29-31, 283-284, 1989.
 14. Yagi, K. : Lipid peroxides and diseases, *Chem. and Phys. of Lipid*, 45:337 1987.
 15. 張文彭 外 : 老年腎虛證血漿過氧化脂質高密度脂蛋白膽固醇及其亞組分水平變化, *中醫雜誌*, 30(2):43-46, 1989.
 16. 王學美 外 : 五子衍宗液延緩衰老的臨床觀察, *中國中西醫結合雜誌*, 12(1):23-25, 1992.
 17. 余月明 外 : 自由基衰老學說, 腎虛與衰老及補腎抗衰老研究, *陝西中醫*, 14(4):187-188, 1993.
 18. 許沛虎 外 : 中醫藥研究中有關自由基研究近況, *中西醫結合雜誌*, 15(3):185-188, 1995.
 19. 梁曉春 外 : 腎虛, 衰老與自由基的關係以及補腎葯對自由基的影響, *中西醫結合雜誌*, 10(8) : 511-512, 1990.
 20. 陳晏珍 外 : 腎虛與超氧化物歧化酶關係初探, *中醫雜誌*, 30(4):42, 1989.
 21. 杜 辛 外 : 還少丹膠囊抗衰老及治療腎陽虛臨床觀察, *中國中西醫結合雜誌*, 12(1) : 20-22, 1992.
 22. 張文彭 外 : 清宮長春丹對老年腎虛證血漿過氧化脂質高密度脂蛋白膽固醇水平影響的研究, *中醫雜誌*, 30(3):34, 1989.
 23. 王其飛 外 : 中醫長壽學, 遼寧科學技術出版社, pp.50,53,54,331-336,342-344,348-350,1989
 24. 張介賓 : 景岳全書(下), 大成文化社, pp.416-417, 1988.
 25. 尹哲浩, 鄭智天 : 左歸飲과 右歸飲이 老化 Rat의 肝 過酸化脂質 生成 및 活性 酸素 生成系 酵素 活性에 미치는 影響, *大韓韓方內科學會誌*, 16(1):62-80,1995.
 26. 尹哲浩, 鄭智天, 朴宣東 : 左歸飲과 右歸飲이 老化 Rat의 腦 過酸化脂質 生成 및 活性 酸素 生成系 酵素 活性에 미치는 影響, *大韓韓醫學會誌*, 16(2):348-364, 1995.
 27. 申興默, 金吉萱 : 命門動氣의 生理作用에 對한 實驗的 研究-右歸飲과 右歸飲加 肉蓯蓉이 飢餓 白鼠 血中 호르몬 및 SOD 活性에 미치는 影響, *東醫生理學會誌*, 6(1):1-23, 1991.
 28. Martin, J. P., Dailey, M. and Sugarman, E. : Negative and positive assays of superoxide

- dismutase based on hematoxylin auto-oxidation. *Arch. Biochem.*, 255:329-336, 1987.
29. Paglia, E. D. and Valentine, W. N. : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J.Lab. Clin.Med.*, 70:158-169, 1967.
30. Richmond, R., Halliwell, B., Chauhan, J. and Darbre, A. : Superoxide dependent formation of hydroxyl radicals : Detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compounds. *Anal. Biochem.*, 118:328-335 1981.
31. Azzi, A., Montecucco, C. and Richter, C. : The use of acetylated ferricytochrome c for the detection of superoxide radicals produced in biological membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65:597- 603 1975.
32. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, 193 :265-275, 1951.
33. Barry, H : Oxidants and human disease : Some new concepts. *FASEB.J.*, 1:358-364, 1987.
34. David, R.: Mechanistic toxicology: A radicalperspective. *J.Pharm.pharmacol.*, 41 :505-511, 1989.
35. Simon, R. H., Scogging, C. M. and Patterson, D.: Hydrogen peroxide cause the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals.*J.Biol. Chem.*, 266:7181-7186, 1981.
36. Massey, V., Strickland, S., Mayhew, S. G., Howell, L. G. and Engel, P. C. : The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoprotein with molecular oxygen. *Biochem.Biophys.Res. Comm.*, 36:891-897, 1969.
37. Freemann B. A. and Crapo, J. D. : Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47:412-426, 1982.
38. Trush, A. M., Mimnaugh, E. G. and Gram, T. E. : Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem. Pharmacol.*, 31:3335-3346, 1982.
39. Bodanes, R. S. and Chan, P. C. : Singlet oxygen as a mediator in hematoporphyrin-catalyzed photooxidation of NADPH to NADP⁺ in deuterium oxide. *J.Biol.Chem.*, 252:8554-8560, 1977.
40. Corfran, R. S., Kumar, V. and Robbins, S. L. : Robbins pathologic basis of disease., W.B.Saunders, Philadelphia, p.1-38, 1989.
41. 金完熙, 崔達永 : 臟腑辨證論治, 成輔社,

- pp.282-284, 1985.
42. 杜鎬京 : 東醫腎系學(上), 東洋醫學研究院, pp.10-11, 1993.
 43. 南京中醫學院醫經教研組 : 黃帝內經素問譯釋, 上海科學技術出版社, pp.4-5, 1983.
 44. 虞搏 : 醫學正傳, 成輔社, p.9, 1986.
 45. 楊蘊祥 : 古今名方, 河南科學技術出版社, pp.132-133, 1983.
 46. 于世良 : 中醫名方精釋, 中醫古籍出版社, pp.1138-139,145-146, 1993.
 47. 馬瑞珩 : 中藥的抗衰延年作用, 浙江中醫學院學報, 15(6):49-51, 1991.
 48. 舒守琴 外 : 27種中藥及SOD對體外大白鼠腦均漿過氧化脂質生成的影響, 山東中醫學院學報, 15(3):70-72, 1991.
 49. 李獻平 外 : 四大懷藥延緩衰老作用的研究, 中西醫結合雜誌, 11(8):486-487, 1991
 50. 李為 外 : 口服枸杞子對老年人血中超氧化物歧化酶,血紅蛋白和過氧化脂質含量的動態觀察, 中草藥, 22(6):251,268, 1991.
 51. 李春生 : 中國傳統延緩衰老藥物的現代研究概述, 中醫雜誌, 29(1):59-62, 1988.
 52. 曾一飛 外 : 補腎抗衰口服液抗自由基損傷的實驗研究, 四川中醫, 10:12-14, 1992.
 53. 莫新民 外 : 抗衰延壽方對家蠅壽命的影響, 中草藥, 24(7):358-359, 1993.
 54. 劉小英 : 枸杞的抗衰藥理研究與臨床應用概述, 四川中醫, 7:18-19, 1993.
 55. Oyanagui, Y. : SOD and active oxygen modulators, Nihon Igakukan, Tokyo, p.17-36, 1989.
 56. Safirstein, R., Winston, J., Goldstein. M, *et al.* : Cisplatin nephrotoxicity. *Am J. Kidney Dis.*, 8:356, 1986.
 57. Frank, L. and Massaro, D. : Oxygen toxicity. *Am. J. Med.* 69:117-126, 1980.
 58. Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. : Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 59:527, 1979.